

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет водного господарства  
та природокористування  
Кафедра екології, технології захисту навколишнього середовища та  
лісового господарства

**05-02-312М**

### **МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**

для виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни  
**«БІОХІМІЯ»**  
для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня  
за освітньо-професійною програмою  
«Біотехнології, біоробототехніка та біоенергетика»  
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
галузі знань 16 «Хімічна та біоінженерія»  
денної і заочної форм навчання

Рекомендовано  
науково-методичною радою з якості  
ННІ агроєкології та землеустрою  
протокол № 5 від 17.02.2021 р.

Рівне – 2021

Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Біохімія» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною програмою «Біотехнології, біоробототехніка та біоенергетика» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» галузі знань 16 «Хімічна та біоінженерія» денної і заочної форм навчання. [Електронне видання] / Бедункова О. О. – Рівне : НУВГП, 2021. – 44 с.

Укладач: Бедункова О. О., доктор біологічних наук, професор кафедри екології, технології захисту навколишнього середовища та лісового господарства.

Відповідальний за випуск: Клименко М. О., доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри екології, технології захисту навколишнього середовища та лісового господарства.

Керівник групи забезпечення спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Грицина О. О.

© Бедункова О. О., 2021  
© Національний університет водного господарства та природокористування, 2021

## Зміст

Передмова.....	3
<i>Лабораторна робота №1.</i> Порівняння будови і амінокислотного складу різних білків за допомогою кольорових реакцій.....	5
<i>Лабораторна робота №2.</i> Фізико-хімічні властивості білків...	12
<i>Лабораторна робота №3.</i> Кількісне визначення білку за Горналом.....	16
<i>Лабораторна робота №4.</i> Складні білки.....	19
<i>Лабораторна робота №5.</i> Ферментативне розщеплення перекису водню.....	23
<i>Лабораторна робота №6.</i> Визначення активності амілази по Вольгемуту.....	27
<i>Лабораторна робота №7.</i> Хімічна будова та властивості вуглеводів.....	28
<i>Лабораторна робота №8.</i> Хімічні властивості та обмін ліпідів.....	
<i>Лабораторна робота №9.</i> Якісні реакції на вітамін С .....	36
<i>Лабораторна робота №10.</i> Кісні реакції на вітаміни групи В..	40
Рекомендована література.....	44

## Передмова

Наука біохімія вивчає хімічний склад, будову та перетворення хімічних речовин у живому організмі. Актуальність навчальної дисципліни «Біохімія» полягає в опануванні знань про будову, властивості та біологічні функції білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів, ліпідів, вітамінів.

Вивчення дисципліни здобувачами вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною програмою «Біотехнології, біоробототехніка та біоенергетика» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» спрямоване на забезпечення компетентностей: здатність використовувати ґрунтовні знання з хімії та біології в обсязі, необхідному для досягнення інших результатів освітньої програми та здатність складати технологічні схеми виробництв біотехнологічних продуктів різного призначення.

Виконання лабораторних робіт у ході вивчення дисципліни сприяє:

- розвитку навичок студентів самостійної роботи з біологічним матеріалом в лабораторії, творчого відношення до роботи, вміння аналізувати та давати пояснення явищам, які спостерігаються;
- вивченню закономірностей хімічної будови та функціонування живої матерії у модельних експериментах;
- вивченню можливостей використання аналітичних методів у різних напрямках біотехнологій.

Дані методичні вказівки наводять 10 лабораторних робіт, до кожної з яких наведено загальну структуру роботи, порядок виконання, перелік реактивів та обладнання, контрольні запитання.

## Лабораторна робота №1

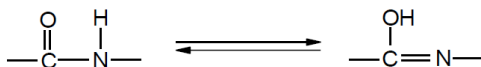
**Тема роботи:** Порівняння будови і амінокислотного складу різних білків за допомогою кольорових реакцій.

**Мета роботи:** провести серію експериментальних спостережень за реакціями виявлення в молекулі білка амінокислот.

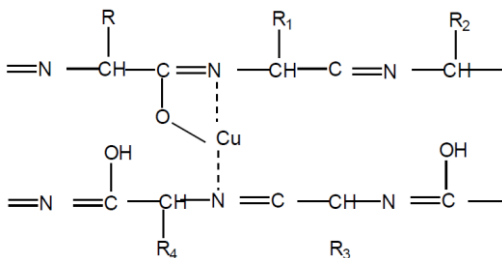
### Структура роботи

Кольорові реакції засновані на утворенні забарвлених продуктів при взаємодії білків з деякими хімічними речовинами і обумовлені присутністю в молекулі білка тієї чи іншої амінокислоти. Ці реакції дають можливість не тільки виявити наявність білка в розчині, а й виявити присутність окремих амінокислот в молекулі білка. На основі деяких кольорових реакцій розроблені методи кількісного визначення білка і амінокислот.

**I. Біуретова реакція (Піотровського)** обумовлена наявністю пептидних зв'язків у молекулі білка. Для пептидної (амідної) групи характерна кето-енольна (лактам-лактимна) таутомерія:



При додаванні сірчанокислої міді до лужного розчину білка утворюються комплексні сполуки міді з пептидними угрупованнями, зафарбованими в фіолетовий колір. При цьому переважаючи в лужному середовищі енольні форми пептидних зв'язків утворюють ковалентні зв'язки з іоном міді за рахунок водню енольного гідроксилу, а координаційні - за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп.

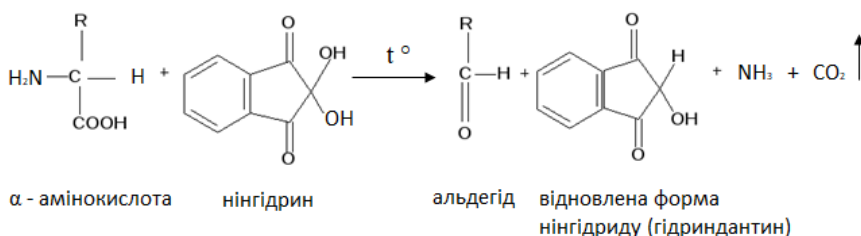


Біуретову реакцію дають всі з'єднання, що містять у молекулі дві та більше двох близько розташованих пептидних зв'язків, наприклад, біурет  $\text{NH}_2\text{--CO--NH--CO--NH}_2$  (продукт конденсації двох молекул сечовини), оксамид  $\text{NH}_2\text{--CO--CO--NH}_2$ .

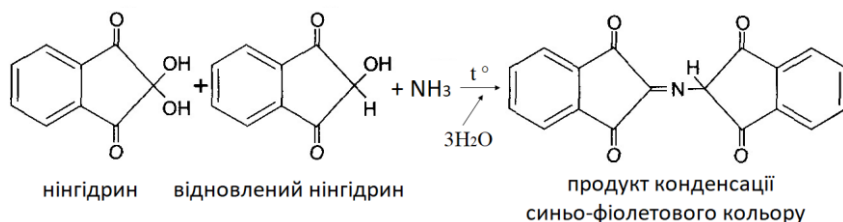
### Порядок виконання

В одну пробірку наливають 10 крапель розчину ясного альбуміну, в іншу – 10 крапель розчину желатини. Потім в обидві пробірки додають по 10 крапель 10% розчину NaOH і по 1 краплі 2% розчину  $\text{CuSO}_4$ , перемішують. Порівнюють колір пробірок, пояснюють отриманий результат.

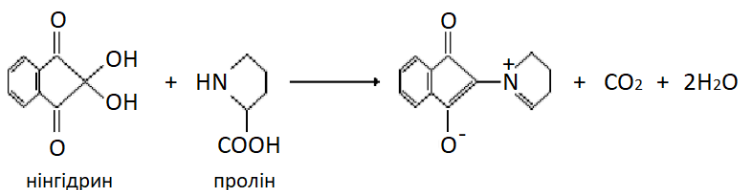
2. Нінгідринова реакція відкриває вільні  $\alpha$ -аміногрупи в молекулі білку. В ході реакції N-кінцева  $\alpha$ -амінокислота окислюється киснем нінгідрину та розпадається з утворенням аміаку,  $\text{CO}_2$  та відповідного альдегіду.



Відновлений нінгідрин конденсується з іншою молекулою нінгідрину і аміаком, утворюючи продукт синьо-фіолетового кольору.



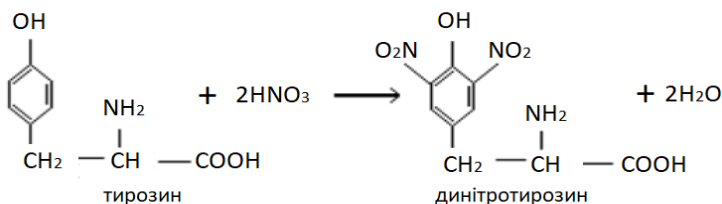
Аналогічно реагують вільні  $\alpha$ -амінокислоти, за винятком проліну, при взаємодії з яким утворюється продукт конденсації жовтого кольору.



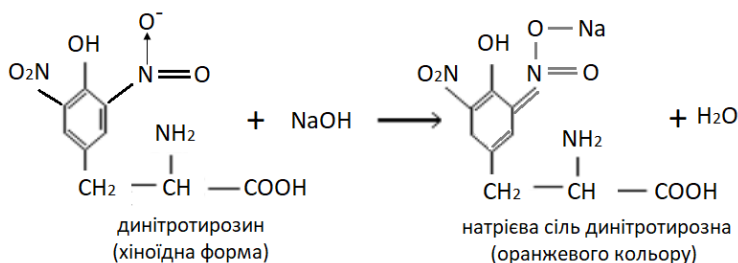
### Порядок виконання

У дві пробірки, що містять по 10 крапель розчину альбуміну та желатини відповідно, додають по 10 крапель 0,1% розчину нінгідрину та нагрівають до кипіння. Пояснюють отриманий результат.

3. Ксантопротеїнова реакція (Мульдера) обумовлена присутністю в молекулі білку ароматичних амінокислот. При нагріванні цих амінокислот з концентрованою азотною кислотою утворюються їх нітропохідні, зафарбовані в жовтий колір.



У лужному середовищі нітропохідні амінокислот набувають оранжевого забарвлення.

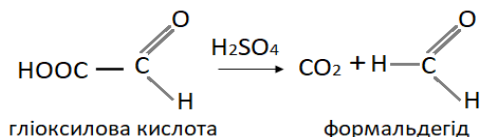


### Порядок виконання

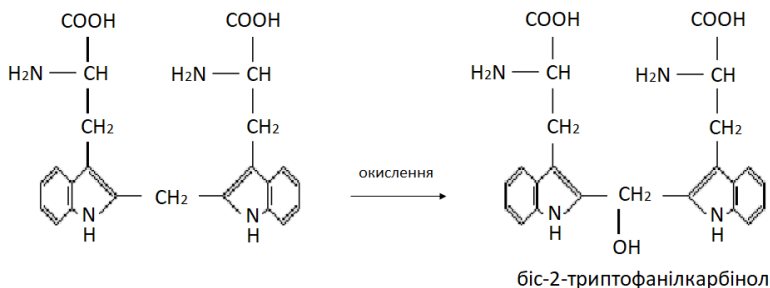
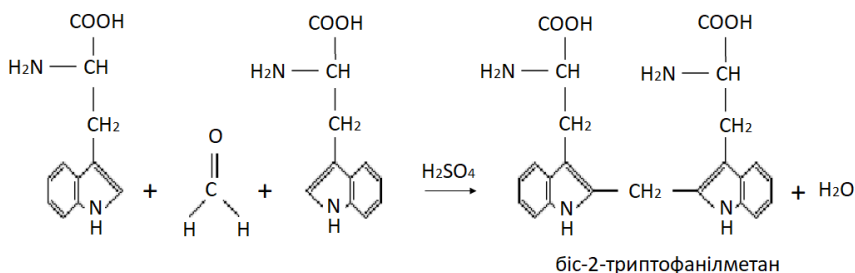
В одну пробірку наливають 10 крапель яєчного альбуміну, в іншу – 10 крапель желатини. Потім у обидві пробірки додають по 5 крапель концентрованої азотної кислоти та поступово доводять до

кипіння. Відмічають колір, що з'явився. Після охолодження до пробірок додають по стінці по 10 крапель 10% розчину NaOH. Спостерігають зміну кольору. Пояснюють отриманий результат.

4. Кольорові реакції на триптофан. Індольне кільце триптофану в кислому середовищі реагує з альдегідами, утворюючи зафарбовані продукти конденсації. Частіше всього для виявлення триптофану використовують реакцію Адамкевича-Гопкінса-Коля з гліоксиловою кислотою. Гліоксилова кислота декарбоксилізується під дією концентрованої сірчаної кислоти та утворює формальдегід, котрий і вступає в реакцію з триптофаном.



У результаті конденсації двох молекул триптофану та однієї молекули формальдегіду утворюється біс-2-триптофанілметан, який потім окислюється до біс-2-триптофанілкарбінола, який має червоно-фіолетове забарвлення.





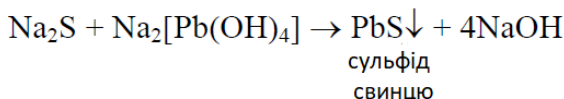
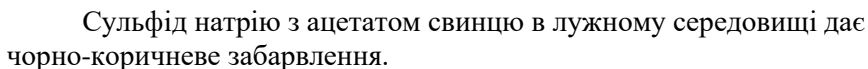
OCC1(O)C(O)C(O)C(O)C1O>>O=C1C=CC(=O)C=C1O

фруктоза

оксиметилфурфол

### Порядок виконання

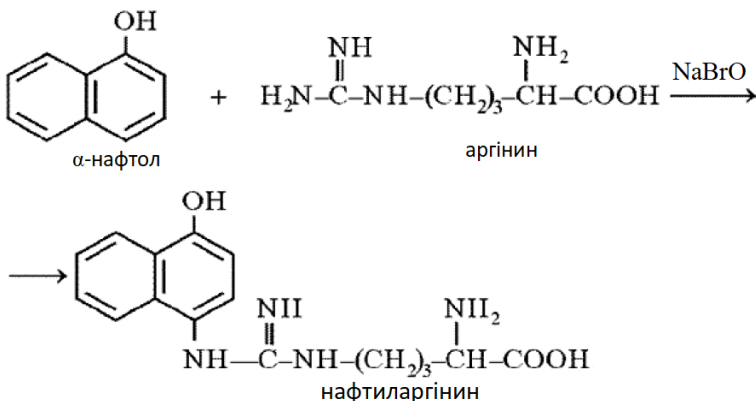
5. Реакція Фолія обумовлена наявністю в білках сірковмісних амінокислот, які при кип'ятінні з лугом втрачають сульфур у вигляді сульфіда натрію.



### Порядок виконання

В одну пробірку наливають 10 крапель розчину яєчного альбуміну, в іншу – 10 крапель розчину желатини. Потім у обидві пробірки додають 20 крапель 10% розчину NaOH та обережно кип'ятять протягом 3 хв. Потім додають по 1 краплині 5% розчину оцтовокислого свинцю. Пояснюють отриманий результат.

6. Реакція Сакагуті на аргінін. Гуанідинова група аргініну, що входить до складу білків, окислюється гіпобромітом натрію, потім продукт окислення взаємодіє з  $\alpha$ -нафтолом, утворюючи речовину червоного кольору.



### Порядок виконання

В одну пробірку наливають 10 крапель розчину яєчного альбуміну, в іншу – 10 крапель розчину желатини. Потім у обидві пробірки додають по 5 крапель 10% розчину NaOH і по 5 крапель 1% спиртового розчину  $\alpha$ -нафтола. Перемішують, потім приливають по 3 краплі 2% розчину гіпоброміта натрію. Пояснюють результат.

Отримані в усіх експериментах дані заносять до таблиці:

Назва реакції	Використані реактиви	Досліджуваний білок	Колір, що з'явився	Чим обумовлена реакція
Біуретова реакція	NaOH CuSO <sub>4</sub>	Альбумін Желатин	Фіолетова Фіолетова	Взаємодія іонів міді з пептидними угрупованнями
...	...	...	...	...

### ***Реактиви та обладнання:***

1. Альбумін яєчний, 1% розчин.
2. Желатин, 1% розчин.
3. Нінгідрин, 0,1% розчин.
4. Фруктоза, 10% розчин.
5. NaOH, 10% розчин.
6. CuSO<sub>4</sub>, 2% розчин.
7. HNO<sub>3</sub>, концентрована.
8. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрована.
9. Сvineць оцтовокислий, 5% розчин.
10. α-нафтанол, 10% спиртовий розчин.
11. Натрій гіпобромід, 2% розчин: 2 г брома (0,65мл) розчиняють у 100 мл 5% розчину їдкого натрію при охолодженні льодом (відносна щільність броду 3,12). Розчинення проводять у витяжній шафі.
12. Спиртівки.
13. Піпетки.
14. Пробірки.
15. Тримачі для пробірок.

### ***Контрольні запитання:***

1. Чи є подібність у будові альбуміна і желатина?
2. У чому полягає відмінність амінокислотного складу альбуміна і желатина?
3. Чи є можливість використання кольорових реакцій в аналітичній практиці?
4. Опишіть хімічний механізм біуретової кольорової реакції на білки.
5. Опишіть хімічний механізм нінгідринової кольорової реакції на білки.
6. Опишіть хімічний механізм ксантопротеїнової кольорової реакції на білки.
7. Опишіть хімічний механізм кольорової реакції на триптофан.
8. Опишіть хімічний механізм кольорової реакції Фоля на білки.
9. Опишіть хімічний механізм кольорової реакції Сакагуті на аргінін.

## *Лабораторна робота №2*

**Тема роботи:** Фізико-хімічні властивості білків.

**Мета роботи:** провести серію експериментальних спостережень за реакціями осадження білка з використанням різних хімічних сполук у якості осаджувачів.

### *Структура роботи*

Два основних фактори дозволяють утримуватись важким молекулам білка в розчині. По-перше – наявність гідратної оболонки; по-друге – наявність заряду білкової молекули. Гідратна оболонка – це шар молекул води, що певним чином орієнтовані на поверхні білкової молекули. Поверхня більшості білкових молекул заряджена від'ємно, а диполі молекул води притягуються до неї своїми додатньо зарядженими полюсами. Чим більше гідрофільних властивостей у білкової молекули, чим більше в її складі та на її поверхні амінокислот з полярними (гідрофільними радикалами), тим сильніше виражена та міцніше утримується гідратна оболонка і тим більше в ній шарів. Вода гідратної оболонки володіє особливими властивостями: вона не є вільною, вона зв'язана з білковою молекулою – “зв'язана” вода. Оточуючи кожную молекулу білку, гідратна оболонка не дає цим білковим молекулам зблизитись, з'єднатись та випасти в осад. Щоб осадити білок із розчину, необхідно позбавити його обох факторів стабілізації: і заряду і гідратної оболонки.

Реакції осадження білків досить різноманітні. Залежно від реагенту, що використовується вони можуть бути зворотними та незворотними. До незворотних належать реакції осадження білків солями важких металів, нагріванням, мінеральними та органічними кислотами. Зворотні реакції осадження білків можна провести, використовуючи в якості осаджувача органічні розчинники (на холоді) або солі лужних металів. Глибоких змін у молекулі білка не відбувається, тому отриманий осад добре розчиняється у вихідному розчиннику, і білок повністю зберігає свої нативні властивості.

1. Висолювання білків. Це зворотне осадження білків з розчину шляхом додавання нейтральних солей (особливо сульфатів) у високих концентраціях. При висолюванні відбувається

дегідратація молекул білків та позбавлення заряду. Процес осадження залежить від молекулярної маси та заряду білка, ступені гідрофільності.

#### *Порядок виконання*

До 20 крапель розчину яєчного білку приливають по стінці рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію. На межі рідин утворюється біле кільце – осад глобуліну. Вміст пробірки фільтрують, а до фільтрату, помішуючи скляною паличкою, додають малими порціями порошок сульфату амонію, до повного насичення розчину. Розчин мутнішає – осаджуються альбуміни. Половину вмісту пробірки переносять в чисту пробірку та додають 20 крапель дистильованої води. Осад розчиняється. Пояснюють отримані результати.

2. Осадження білку спиртом, ацетоном засновано на дегідратації молекул білка. Короткотерміновий вплив спирту на холоді не порушує структури білка, за кімнатної температури відбувається денатурація білка.

#### *Порядок виконання*

До 10 крапель розчину альбуміну додають 10 крапель етанолу. Відмічають осадження білка. Потім у пробірку приливають 20 крапель дистильованої води – осад не розчиняється.

3. Осадження білку кислотами. Концентровані мінеральні та деякі органічні кислоти викликають денатурацію білкових молекул. Крім того, мінеральні кислоти дегідратують молекули білку.

#### *Порядок виконання*

У дві пробірки наливають по 10 крапель розчину альбуміну. Потім у першу пробірку додають 5 крапель 10% трихлороцтової кислоти, в другу – 5 крапель концентрованої азотної кислоти. Відмічають випадіння осаду, який не зникає при додаванні води.

4. Осадження білку солями важких металів. Іони важких металів при взаємодії з білками (особливо з групами SH) утворюють нерозчинні у воді комплекси. Білок при цьому піддається денатурації.

#### *Порядок виконання*

У дві пробірки наливають по 10 крапель розчину альбуміну. До першої пробірки приливають 2 краплі 2% розчину сульфату міді, до другої – 2 краплі 5% розчину ацетату свинцю. Відмічають появу осаду, який не зникає при додаванні води.

5. Осадження білку при нагріванні. При нагріванні розчину білку до 60-70 °С відбувається, як правило, випадіння білка в осад. Це пов'язано з глибокими порушеннями структури білкової молекули.

Важливе значення в осадженні денатурованого білку має концентрація водневих іонів (рН). Найбільш повне та швидке осадження відбувається в ізоелектричній точці білку. В сильнокислих та сильнолужних розчинах денатурований при нагріванні білок не випадає в осад, оскільки молекули білку несуть у першому випадку додатний, а в другому – від'ємний заряд.

#### *Порядок виконання*

У чотири пронумеровані пробірки наливають по 10 крапель розчину альбуміну. Потім у другу пробірку додають 1 краплю 1% розчину оцтової кислоти, в третю – 5 крапель 10% розчину оцтової кислоти, в четверту – 5 крапель 10% розчину їдкого натрію. Всі пробірки нагрівають до кипіння та відмічають відсутність або випадіння осаду, а також його характер. Пояснюють результати.

6. Визначення ізоелектричної точки білку. Молекули білку мають електричний заряд, що виникає в наслідок іонізації вільних карбоксильних груп і аміногруп. Заряд білку залежить, по-перше, від амінокислотного складу білку, по-друге, від рН середовища. При певному значенні рН сумарний заряд молекули білку може стати рівним нулю. Це значення рН називається ізоелектричною точкою білку (ІЕТ). Різні білки мають різні ІЕТ. У кислих білків ІЕТ лежить при  $\text{pH} < 7$ , в основних – при  $\text{pH} > 7$ .

В ізоелектричному стані білок максимально нестійкий і дуже легко може бути осаджений з розчину. Ця властивість поведінки білку використовується для експериментального визначення його ІЕТ.

#### *Порядок виконання*

У чотири пронумеровані пробірки наливають із бюреток по 2 мл буферного розчину з різними значеннями рН (3,0; 4,0; 5,0; 6,0) і по 2 мл розчину желатину. Вміст пробірок перемішують, не допускаючи утворення піни, потім до кожної пробірки обережно, не перемішуючи, нашаровують по 1 мл спирту. Через 30 хв. Відмічають пробірку, в якій спостерігається найбільш інтенсивне (за рахунок випадіння осаду білку) помутніння на межі розділу рідин. рН розчину в цій пробірці відповідає ІЕТ даного білку.

Ступінь помутніння позначають так: (-) – відсутність помутніння; (+) – виражене помутніння; (+++) – максимальне помутніння.

Отримані результати заносять до таблиць:

*Осадження білку*

Назва групи осаджувачів	Реактиви, що використовувались	Характер осаду	Чим обумовлено осадження
Нейтральна сіль	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ розчин	Біле кільце (глобулін)	Дегідратація білку, позбавлення заряду
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ кристалічний	Помутніння розчину (альбумін)	...
...	....	...	...

*Визначення ізоелектричної точки білку*

№ пробірки	pH буферного розчину	Ступінь помутніння на межі розділу середовищ
1	...	...
...	...	...

***Реактиви та обладнання:***

1. Альбумін яєчний, 1% розчин.
2. Сульфат амонію, насичений розчин.
3. Сульфат амонію кристалічний.
4. Трихлороцтова кислота, 10% розчин.
5. Сvineць оцтовокислий, 5% розчин.
6. Оцтова кислота, 1 та 10% розчини.
7. Спирт етиловий.
8.  $\text{HNO}_3$  концентрована.
9. Мідь сірчаноокисла, 2% розчин.
10. Натр їдкий, 10% розчин.
11. Желатин, 1% розчин.
12. Буферні системи з pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0.
1. Скляні палички.
2. Фільтри паперові.
3. Лійки діаметром 3-5 см.
4. Пробірки звичайні.
5. Піпетки очні.

6. Спиртівки.
7. Піпетки на 1 мл.
8. Бюретки на 50 мл.
9. Штативи з пробірками.
10. Олівець по склу.

### ***Контрольні запитання:***

1. Пояснити механізми зворотного та незворотного осадження білку.
2. На якому принципі засноване явище осадження білку?
3. У чому полягає практичне застосування реакцій осадження білку?
4. Що таке гідратна оболонка.
5. Що означає “зв’язана” вода?
6. Як холод або тепло можуть впливати на осадження білку?
7. На чому заснований спосіб осадження білку спиртом?

### ***Лабораторна робота №3***

***Тема роботи:*** Кількісне визначення білку за Горналом.

***Мета роботи:*** опанувати колориметричний метод хімічного визначення кількісного вмісту білку в розчині.

### ***Структура роботи***

Визначення вмісту білку є одним з найбільш важливих і часто використовуваних методів у науково-дослідних і клінічних лабораторіях, в умовах виробництва.

Для кількісної оцінки білків використовуються фізичні, хімічні та біологічні методи. Найрізноманітніші хімічні методи, зокрема колориметричні. Вони засновані на вимірюванні інтенсивності забарвлення, яка розвивається, коли білки взаємодіють з "spethic reagents" (див. лабораторну роботу №1 «Порівняння структури і амінозного складу різних білків за кольоровими реакціями»). Щоб обчислити інтенсивність забарвлення для обчислення концентрації білка, створюють калібрувальний графік.



З колориметричних методів визначення білку особливу увагу заслуговують методи, засновані на біотичній реакції. Вони дуже специфічні, точні і прості в цьому, не вимагають дефіцитних реагентів, хоча їх чутливість низька.

У лабораторній практиці широко застосовується метод Горнала, заснований на формуванні зафарбованого в фіолетовий колір комплексу пептидних зв'язків білку з іонами двовалентної міді в лужному середовищі.

#### *Порядок виконання*

Для побудови схеми калібрування використовується стандартний розчин альбуміну (С 20 мг/мл), з якого готуються робочі розчини білку різної концентрації відповідно до таблиці:

№ пробірок	Стандартний розчин білку, мл	Вода, мл	Вміст білку в пробі, мг	Концентрація білку, мг/мл	Оптична щільність розчину
1	0,5	4,5	10	2,0	
2	1,0	4,0	20	4,0	
3	1,5	3,5	30	6,0	
4	2,0	3,0	40	8,0	
5	2,5	2,5	50	10,0	

Потім беруть 5 пробірок і вливають до них 1 мл білкового розчину різної концентрації з відповідних пробірок з робочими розчинами (від 2,0 до 10,0 мг/мл). Додають до кожної пробірки 4 мл біуретового реактиву та акуратно перемішують. До 6-ї пробірки наливають 1 мл води і 4 мл біуретового реактиву (контроль на реактивні речовини). М'яко змішують білкові розчини, уникаючи утворення піни! Через 30 хвилин фарбовані розчини фотометрують на ФЕК із зеленим світловим фільтром (540-550 нм) у кюветах з товщиною світлопоглинального шару 10 мм навпроти контрольного розчину.

Отримані значення екстинції (оптичної щільності розчину) використовують для побудови калібрувального графіка. Для цього на вісь х наносять значення використаних концентрацій білку (С) з 2,0-10,0 мг/мл, на вісь у – відповідні їм значення екстинції (Е). Графік являє пряму, що проходить через початок координат. При більших концентраціях білку лінійна залежність порушується, на

графіку з'являється вигин. Калібрувальний графік будується знову при роботі з іншим приладом або іншими реактивами.

*Визначення білку в досліджуваному розчині:* в шосту та сьому пронумеровані пробірки вносять відповідно 1 мл дистильованої води (контроль на реактиви) та 1 мл дослідного розчину (що містить від 1 до 10 мг білку), додають в обидві пробірки по 4 мл біуретового реактиву, обережно перемішують. Через 30 хвилин фотоколориметрують при зеленому світлофільтрі з тією ж довжиною хвилі в кюветах з товщиною світло поглинального шару 10 мм проти контролю. Концентрацію білку в розчині визначають по калібрувальному графіку. При визначенні білку в сироватці крові (6-8% білку) її необхідно розвести як мінімум у 10 разів.

При взаємодії білків у лужному середовищі з сірчанокислою міддю з'являється фіолетове зафарбування внаслідок утворення комплексної мідно-натрієвої солі білку.

#### ***Реактиви та обладнання:***

1. Сироватка крові.
2. Стандартний розчин білку (альбумін): 1 г кристалічного білку розчиняють у 50 мл 0,9 % розчину хлориду натрію. Отриманий стандартний розчин білку містить 20 мг білку в 1 мл.
3. Біуретовий реактив: 0,5 г мідного купоросу та 0,6 г виннокислого калію-натрію (сегнетової солі) розчиняють у 50 мл води в мірній колбі на 100 мл при енергійному помішуванні. До розчину поступово додають 30 мл 10% розчину NaOH (вільного від вуглекислого натрію), потім 0,2 г йодистого калію для попередження самовільного відновлення. Розчин доводять водою до 100 мл і зберігають у холодильнику в щільно закритому поліетиленовому або парафінованому посуді.
4. Фотоелектроколориметр (кювети з робочою довжиною 10 мм).
5. Піпетки на 1; 2; 5 мл.
6. Міліметровий папір.
7. Штативи з пробірками.
8. Олівці по склу.

#### ***Контрольні запитання:***

1. На якій реакції засноване кількісне визначення білку по Горналу?

2. У чому полягає суть біуретового методу?
3. До якої групи методів належить колориметрування?
4. Принцип побудови та призначення калібрувального графіку.
5. Які розчини потребують розведення при проведенні визначення білку за методом Горнала?

### ***Лабораторна робота №4***

***Тема роботи:*** Складні білки.

***Мета роботи:*** провести експериментальне визначення компонентів складних білків.

#### ***Структура роботи***

Складні білки (протеїди) – білки, які крім амінокислотних залишків містять у своїй структурі компоненти небілкової природи, так звані простетичні (додаткові) групи. Залежно від хімічної природи цього компонента складні білки діляться на: нуклео-, хромо-, гліко-, ліпо-, фосфопротеїни.

**Глікопротеїни** містять у своїй молекулі крім простого білку вуглецевий компонент. Глікопротеїни присутні майже в усіх тканинах і рідинах організму, в секретах слизових залоз (муцини), входять до складу кісткової, хрящової та з'єднувальних тканин (мукоїди). Вони відіграють важливе значення для організмів, виконуючи опорну, захисну функції, перешкоджають проникненню інфекцій до організму, приймають участь у процесах міжклітинної взаємодії («упізнання»).

#### ***Порядок виконання***

1. Виділення муцину зі слини. До пробірки збирають 1-2 мл слини і по краплинах приливають концентровану оцтову кислоту (2-3 краплини). Випадає осад муцину. Через 3 хвилини рідину фільтрують, згусток на фільтрі промивають водою з піпетки (10-20 крапель), обережно переносять до пробірки і додають 30% розчин натрієвого лугу до повного розчинення осаду (близько 20 крапель). Із вмістом пробірки (лужний розчин муцину) проводять наступні реакції:

2. Реакція на білковий компонент. До 10 крапель лужного розчину муцину додають 1-2 краплі 2% розчину  $\text{CuSO}_4$ . Позитивна біуретова реакція доводить наявність у пробі білку.

3. Реакція на вуглевод. До 10 крапель розчину муцину додають 2 краплі розчину  $\alpha$ -нафтолу, добре перемішують. Розчин нейтралізують, обережно додаючи 3 краплини концентрованої  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Після припинення реакції обережно підшаровують рівну сумарному об'єму кількість концентрованої  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (15-20 крапель). На межі розділу рідин з'являється зафарбоване кільце фіолетового кольору.

**Фосфопротеїни** містять у якості простетичної групи фосфорну кислоту. Вони слугують важливим поживним матеріалом для розвитку ембріонів та організмів у фазі активного росту. Так, казеїн молока, вітелін яєчного жовтку включають всі незамінні амінокислоти та найважливіші мінеральні речовини – фосфор та калій.

#### *Порядок виконання*

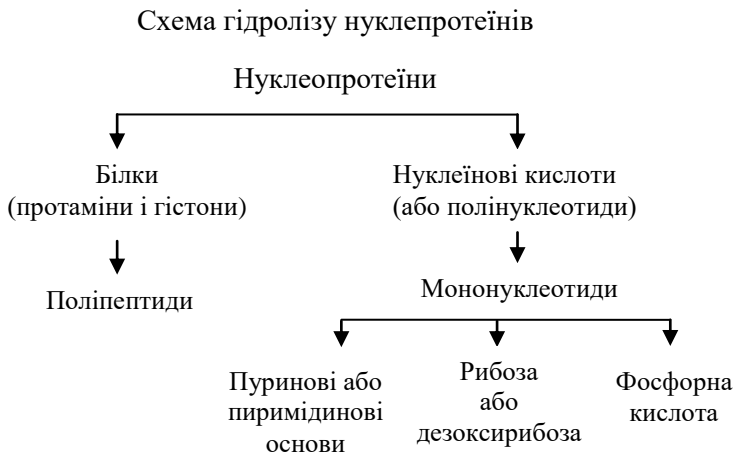
1. Виділення та гідроліз казеїну. До 1-2 мл знежиреного молока додається 1-2 краплини концентрованої оцтової кислоти. Через 5 хвилин надосадну рідину обережно зливають, а в пробірку з осадом казеїну додають 2-3 мл дистильованої води та через 5 хвилин надлишок надосадної рідини зливають, а залишок фільтрують. Казеїн збирають з фільтра до пробірки і розчиняють у 4 мл 10% розчину натрієвого лугу. Вміст пробірки кип'ятять 1 хвилину, потім охолоджують та проводять реакції для виявлення продуктів гідролізу казеїну.

2. Виявлення білку (біуретова реакція). У пробірку наливають 10 крапель гідролізату та додають краплю 2% розчину  $\text{CuSO}_4$ . Спостерігають результат якісної реакції на білок.

3. Виявлення фосфорної кислоти. До 10 крапель гідролізату казеїну додають 1 краплю розчину фенолфталеїну та по краплям концентровану азотну кислоту до знебарвлення. Потім додають 20 крапель молібденового реактиву, нагрівають до кипіння та охолоджують. З'являється жовтий осад фосфомолібдату амонію – результат якісної реакції на наявність фосфорної кислоти.

**Нуклеопротеїни (або нуклеопротеїди)** належать до групи складних білків. Простетичною групою нуклеопротеїнів є нуклеїнові кислоти, які являють собою високомолекулярні з'єднання, що

складаються з нуклеотидів. Нуклеотиди, в свою чергу, складаються з пуринових або піримідинових основ, цукру та фосфорної кислоти. В ході гідролізу нуклеопротейіни розпадаються на основні компоненти:



### *Порядок виконання*

Гідроліз нуклеопротейінів: до колбочки на 100 мл розміщують 2 г дріжджів, попередньо подрібнених, і додають 30 мл розчину 5% розчину  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Вміст колбочки ретельно перемішують. Невелику кількість рідини відфільтровують до пробірки, де після нейтралізації 30% розчином  $\text{NaOH}$  проводять біуретову реакцію. Колбочку закривають корком зі зворотнім холодильником, розміщують у киплячу водяну баню, обережно кип'ятять протягом години. Після цього рідину, що містить продукти гідролізу нуклеопротейінів, охолоджують та фільтрують. З гідролізатом проводять наступні реакції:

1. Реакція на білковий компонент. 10 крапель гідролізату дріжджів титрують 30% розчином  $\text{NaOH}$  до лужної реакції та додають 1-2 краплі 2% розчину  $\text{CuSO}_4$ .

2. Реакція Моліша на вуглеводи. До пробірки наливають 10 крапель гідролізату, додають 30% розчин  $\text{NaOH}$  до лужної реакції, потім додають 5 крапель  $\alpha$ -нафтанолу, перемішують. Обережно підшаровують концентровану  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (15-20 крапель). На межі рідин проявляється зафарбоване кільце.

3. Реакція на фосфорну кислоту. До 10 крапель гідролізату додають рівний об'єм розчину молібденового амонію в азотній кислоті та нагрівають до кипіння. Утворюється жовтий осад фосфорно-молібденового амонію.

4. Проба на пуринові основи. 10 крапель гідролізату дріжджів титрують 10% розчином NaOH до нейтральної реакції (по індикатору). Потім додають 3 краплі 1% розчину азотнокислого срібла. З'являється осад.

Отримані результати заносять до таблиці:

% пробірки	Досліджуваний матеріал	Використані реактиви	Відкритий компонент	До якої групи складних білків належить
1	...	...	...	...

### *Реактиви та обладнання:*

1. Дріжджі.
2. Молоко свіже.
3. Слима нерозбавлена.
4. А-нафтанол, 1% розчин у 70% розчині спирту.
5. Фенолфталеїн, 1% спиртовий розчин.
6. Молібденовий реактив: 7,5 г молібдату амонію розчиняють у воді та додають 50 мл концентрованої азотної кислоти. Повне розчинення настає після додавання  $\text{HNO}_3$ .
7. Оцтова кислота, концентрована.
8. NaOH, 30% і 10% розчини.
9.  $\text{CuSO}_4$ , 2% розчин.
10.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5% розчин та концентрована.
11.  $\text{HNO}_3$ , концентрована.
12. Срібло азотнокисле, 1% розчин.
13. Фільтри паперові.
14. Скляні палички.
15. Лійки діаметром 3-5 см.
16. Водяна баня.
17. Колбочки конічні на 50-100 мл зі зворотнім холодильником.
18. Олівець по склу.
19. Індикаторний папір.
20. Фарфорові ступки з пестиками.

### **Контрольні запитання:**

1. Які компоненти входять до структури складних білків?
2. На які групи діляться складні білки?
3. Біологічне значення складних білків.
4. У чому полягає принцип виявлення глікопротеїнів?
5. До якої групи складних білків належить казеїн?
6. Опишіть схему гідролізу нуклепротеїнів.
7. Для виявлення яких груп складних білків використовують біуретову реакцію?

### **Лабораторна робота №5**

**Тема роботи:** Ферментативне розщеплення перекису водню.

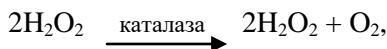
**Мета роботи:** побачити дію ферменту каталази в рослинних і тваринних тканинах, порівняти ферментативну активність натуральних і зруйнованих в процесі кипіння тканин, показати можливості моделювання ферменту каталази.

### **Структура роботи**

В результаті окислювально-відновних процесів в клітинах утворюється перекис водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Сполука ця токсична для клітин, так як може викликати самоотруєння (денатурацію білків, зокрема ферментів). Аеробне життя робить можливим система ферментного захисту клітин, яка усуває токсичні ефекти  $\text{O}_2$ .

Так, накопиченню перекису водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) в клітинах перешкоджає фермент каталаза, поширений в клітинах, здатних існувати в кисневій атмосфері.

Каталаза (від грецьк. *καταλύω* - «руйную») – фермент (оксидоредуктаза), який розкладає перекис водню, що утворюються у процесі біологічного окиснення, на воду та молекулярний кисень:



а також окислює при наявності перекису водню низькомолекулярні спирти і нітрити, і бере таким чином участь у процесі клітинного дихання.

Моделювання ферментативного каталізу - перспективний шлях розвитку хімічної технології найближчого майбутнього.

1. Ферментативне розщеплення перекису водню рослинними і тваринними клітинами. Каталазну активність виявлено у всіх облигатних та факультативних аеробних прокаріот. Каталаза функціонує з дуже великою швидкістю: при 0° С одна молекула каталази розкладає за 1 с до 40 000 молекул перекису водню. Локалізується каталаза в клітинах живих організмів.

#### *Порядок виконання*

Готують тимчасовий препарат листка елодеї і розглядають його при малому збільшенні мікроскопа. З однієї сторони накривного скла капають піпеткою 1-2 краплі розчину перекису водню, з іншої сторони прикладають фільтрувальний папір, щоб під накривне скельце попав розчин  $H_2O_2$ . Уважно спостерігають у мікроскоп, що буде відбуватися, коли клітини елодеї зіткнуться з розчином перекису водню. Пояснюють побачене явище.

В пробірці розміщують по маленькому кусочку (величиною з горошину) сирії і вареної картоплі, сирого і вареного м'яса, сирих і варених легень, сирих і варених нирок і т. д.

До кожної пробірки піпеткою додають 8-10 крапель розчину перекису водню. Результати спостережень заносять до таблиці:

№ з/п	Об'єкт	Явища, які спостерігаються при дії перекису водню	Пояснення спостережень і висновки
1	Сира картопля		
2	Варена картопля		
3	Сире м'ясо		
4	Варене м'ясо		
5	Сирі легені		
6	Варені легені		
7	Сирі нирки		
8	Варені нирки		

2. Дослідження дії неорганічної моделі каталази. Слід сказати, що фермент каталаза містить в своєму складі органічну сполуку заліза, яка входить в склад гемоглобіну крові. Значить, можна спробувати створити неорганічну модель каталази,



підібравши речовини, що будуть її нагадувати, наприклад комплексну сполуку іона міді з аміаком.

#### *Порядок виконання*

До 0,5 мл розчину сульфату міді ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) додають декілька крапель розчину перекису водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Спостерігають за явищем.

До іншої пробірки наливають 0,5 мл розчину сульфату міді і додають 5-10 крапель розчину аміаку. Дають пояснення про що свідчить хімічна реакція між сульфатом міді і аміаком?

До пробірки з тільки що отриманим аміаком міді приливають (обережно) декілька крапель перекису водню. Яке явище ви спостерігаєте на цей раз?

3. Визначення каталазної активності ґрунту. Перекис водню є і в ґрунті, де його також розкладає фермент каталаза мікроорганізмів. Різні ґрунти мають різну каталазну активність, що залежить від умов, в яких знаходяться ґрунти (клімат, температура, вологість ґрунту, характер рослинності і т. д.).

Якісною реакцією біологічної активності ґрунту, яка вказує на родючість ґрунту, нарівні з іншими характерними реакціями, є каталазна активність ґрунту, що вказує на здатність ґрунту розкласти перекис водню.

#### *Порядок виконання*

Метод визначення каталазної активності ґрунту полягає у встановленні кількості молекулярного кисню, який виділяється при розпаді перекису водню у процесі взаємодії його з ґрунтом (газометричний спосіб).

Для цього наважку (1г) ґрунту розмішують у колбу з об'ємом 100 мл. На дно колби за допомогою пінцета ставлять маленький стаканчик з 5 мл 3%-го розчину перекису водню.

Колбу щільно закривають каучуковим корком із скляною трубкою, яка приєднана до вимірювальної бюретки гумовим шлангом. Початок досліду відмічають за секундоміром у той момент, коли стаканчик з перекисом падає і вміст колби струшують.

Кисень, що виділяється, витісняє з бюретки воду, рівень якої відмічають через 0,5; 1; 1,5 та 2 хв. Активність каталази виражають в мл  $\text{O}_2$ , що виділився за 1 хвилину на 1 г ґрунту.

Про екологічний стан досліджуваного ґрунту судять за оціночною шкалою:

<i>Ступінь збагаченості ґрунтів</i>	<i>Каталаза, млО<sub>2</sub>/г /хв.</i>
Дуже бідна	менше 1
Бідна	1 – 3
Середня	3 – 10
Збагачена	10 – 30
Дуже збагачена	більше 30

Варто брати до уваги, що в різних типах ґрунтів та в різні сезони року ферментативна активність змінюється. Тому для адекватної оцінки екологічного стану досліді проводять в одному часовому просторі та на однорідних типах ґрунтів.

### ***Реактиви та обладнання:***

1. 3% розчин перекису водню або таблетки гідропірититу по 1,5 г
2. Листочки елодеї.
3. Мікроскопи.
4. Предметні і накривні скельця.
5. Кусочки сирих і варених: картоплі, м'яса, легень.
6. 10% розчин сульфату міді.
7. 5-10% розчин аміаку.
8. Піпетки.
9. Пробірки.
10. Штативи для пробірок.

### ***Контрольні запитання:***

1. Як утворюється перекис водню в клітинах і яка його роль?
2. Що розкладає перекис водню і яке біологічне значення це має?
3. Що утворюється при розкладі перекису водню? Написати рівняння реакції.
4. Чому каталазна активність ґрунту являється якісною реакцією біологічної активності ґрунту?
5. Чим відрізняється органічний фермент від його неорганічної моделі.
6. Що спільного між дією перекису водню каталази і аміакату міді?
7. Чим відрізняється фермент від його неорганічної моделі?

## **Лабораторна робота №6**

**Тема роботи:** Визначення активності амілази по Вольгемуту.

**Мета роботи:** провести експериментальну оцінку розщеплення крохмалю за участі амілаз слини.

### **Структура роботи**

Амілази (від лат. *Amylum* - крохмаль), ферменти класу гідролаз, що каталізують гідроліз крохмалю та розщеплюють його до олігосахаридів. Визначення активності амілази використовують в діагностичних цілях, зокрема для ідентифікації глікогенезу. Амілази (в тому числі іммобілізовані) також застосовують в промисловості, наприклад  $\alpha$ -амілази - для «оцукровування» крохмалю при виробництві глюкози.

Метод визначення активності амілази по Вольгемуту заснований на знаходженні максимального розведення слини, за якого відбувається повне розщеплення крохмалю. За одиницю активності амілази приймають кількість ферменту, необхідного для розщеплення 1 мл крохмалю за 30 хв. За температури 37° С.

Амілазна активність слини виражається кількістю мл 0,1% розчину крохмалю, яке може розщепити 1 мл нерозведеної слини за температури 37 °С протягом 30 хв. У нормі амілазна активність слини ( $A_{30}^{37}$ ) рівна 160-320 одиниць Вольгемута.

### **Порядок виконання**

У 10 пронумерованих пробірок наливають по 1 мл води. До першої пробірки додають 1 мл слини, попередньо розведеної у 10 разів (1 мл слини + 9 мл води). Вміст першої пробірки добре перемішують і 1 мл суміші переносять до другої пробірки, знову добре перемішують і 1 мл суміші переносять до 3 пробірки і т.д. З десятої пробірки 1 мл суміші виливають. Потім до всіх пробірок додають по 1 мл води і по 2 мл крохмалю (із бюретки, починаючи з останньої пробірки!).

Вміст перемішують і пробірки розміщують у термостат за температури 37 °С на 30 хвилин. Потім пробірки виймають, охолоджують та додають по 1 краплі реактиву Люголя, перемішують. Рідина в пробірках зафарбовується в жовтий, червоний та синій кольори. Відмічають останню пробірку, в якій

відбувся повний гідроліз крохмалю (жовтий колір). Розраховують розведення слини в даній пробірці, наприклад 1/160, а потім проводять розрахунок амілазної активності слини:

1/160 мл слини каталізує перетворення 2 мл крохмалю

1 мл слини

X мл крохмалю

Звідси:  $X = 2 \times 160 = 320$  одиниць Вольгемута.

### ***Реактиви та обладнання:***

1. Слина.
2. Крохмаль, 0,1% розчин.
3. Розчин Люголю: 1% розчин йоду в 2% розчині йодиду калію.
4. Штатив з пробірками.
5. Олівець по склу.
6. Термостат,  $t=37^{\circ}\text{C}$ .
7. Піпетки на 1; 2 мл.
8. Бюретка на 50 мл.

### ***Контрольні запитання:***

1. До якого класу ферментів належать амілази?
2. У чому полягає біологічне значення амілаз?
3. В яких практичних процесах використовують ферменти амілази?
4. На чому заснований метод визначення активності амілази по Вольгемуту?
5. В яких одиницях виражається амілазна активність?

## ***Лабораторна робота №7***

***Тема роботи:*** Хімічна будова та властивості вуглеводів.

***Мета роботи:*** експериментально ознайомитись із реакціями виявлення моносахаридів.

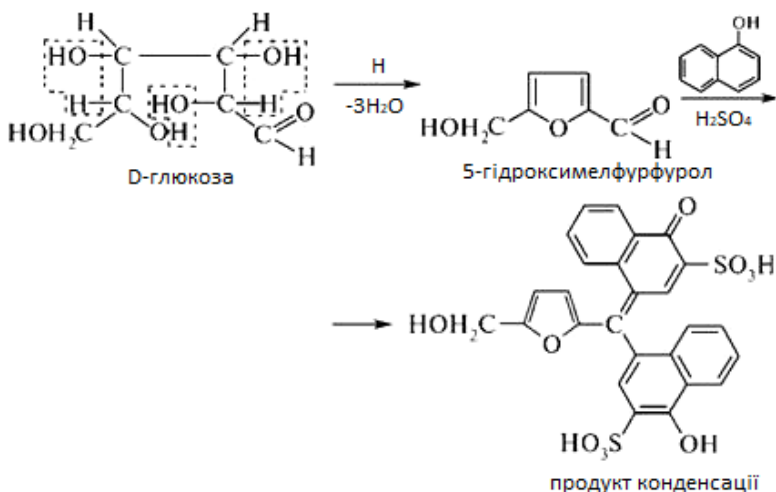
### ***Структура роботи***

Моносахариди та більшість дисахаридів володіють відновлюючими властивостями, причому в моносахаридів вони виражені сильніше, ніж у дисахаридів. Ця реакція обумовлена наявністю в молекулі моносахаридів та деяких дисахаридів

альдегідної групи, яка надзвичайно легко окислюється, перетворюючись у карбоксильну групу та викликає тим самим відновлення, наприклад, металів.

Найбільш розповсюдженими реакціями, за допомогою яких виявляються моносахариди, є реакція Моліша, Троммера і реакція з фелінговою рідиною.

1. Реакція Моліша. Чутливою реакцією на всі вуглеводи є реакція з  $\alpha$ -нафтанолом (реакція Моліша). За дії сірчаної кислоти на вуглеводи утворюється фурфурол та оксимелфурфурол, які конденсуючись з  $\alpha$ -нафтанолом, утворюють зафарбований продукт.

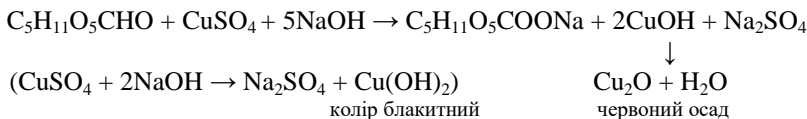


### *Порядок виконання*

У три пробірки наливають по 10 крапель розчинів крохмалю, сахарози та глюкози відповідно, додають по 2 краплі розчину  $\alpha$ -нафтанолу, перемішують. Обережно по стінці підшаровують рівний об'єм концентрованої сірчаної кислоти. На межі шарів швидко утворюється червоно-фіолетове кільце, при збовтуванні суміш розігрівается і забарвлюється по всьому об'єму, а при розведенні її водою виділяються зафарбовані пластівці. За відсутності вуглеводів фіолетове кільце не утворюється, хоча рідина може позеленіти або пожовтіти. Поява фіолетового забарвлення при реакції вуглеводів з  $\alpha$ -нафтолом обумовлена розщепленням молекули вуглеводу при дії концентрованої сірчаної кислоти з утворенням в числі інших

продуктів фурфуролу або його похідних, які вступають в реакцію конденсації з  $\alpha$ -нафтолом, утворюючи забарвлені сполуки.

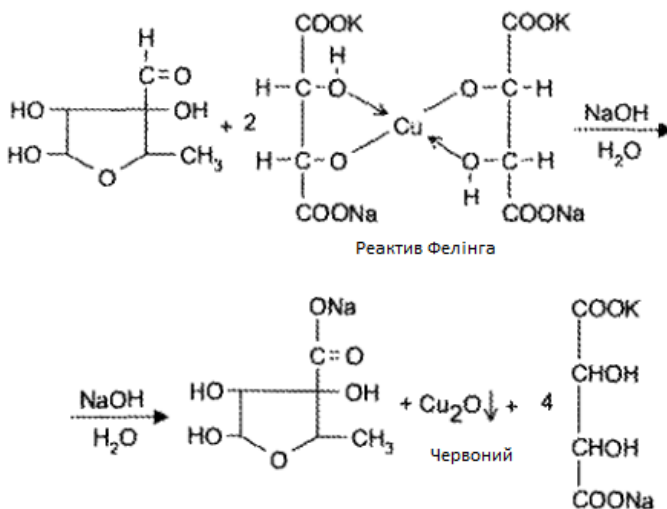
2. Реакція Троммера заснована на редукуючій здатності моносахаридів. У ході реакції Троммера сірчанокисла мідь реагує з лугом, утворюючи блакитний гідроксид міді  $\text{Cu}^{2+}$ , який у присутності цукрів, що містять вільний напівацетальний гідроксид, відновлюється в гідроксид міді. Останній при нагріванні, втрачаючи воду, переходить у оксид міді червоного кольору.



### *Порядок виконання*

До 20 крапель глюкози додають рівний об'єм 10% розчину  $\text{NaOH}$  і 1-2 краплі 2% розчину  $\text{CuSO}_4$ . Вміст пробірки нагрівають до кипіння. Поява жовтого зафарбування, що переходить у червоне, вказує на позитивну реакцію Троммера.

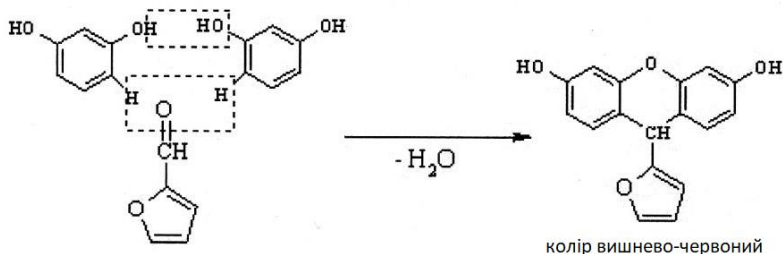
3. Реакція Фелінга, як і попередня, заснована на редукуючій здатності цукрів. Реакція відбувається в присутності сегнетової солі, яка зв'язує надлишок  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , і, відповідно, перешкоджає утворенню  $\text{CuO}$  чорного кольору, який маскує червоний осад  $\text{Cu}_2\text{O}$ .



### Порядок виконання

До 20 крапель розчину глюкози додають рівний об'єм фелінгової рідини та нагрівають. Спостерігають утворення червоного осаду  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

4. Реакція Селіванова. При нагріванні фруктози та інших кетогексоз із соляною кислотою та резорцином розчин зафарбовується в вишневий колір.

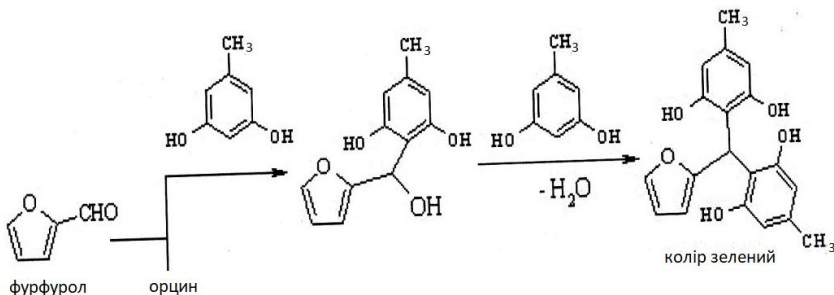


Найявне зафарбування залежить від реакції резорцину з оксиметилфурфуолом, який утворюється при нагріванні кетоз з кислотою.

### Порядок виконання

До 20 крапель розчину фруктози приливають таку ж кількість реактиву Селіванова та нагрівають до кипіння. Спостерігають вишнево-червоне зафарбування.

5. Реакція на пентози. Пентози при кип'ятінні з концентрованою кислотою в присутності орцину дають зелене зафарбування.



### *Порядок виконання*

20 крапель орцинового реактиву нагрівають до кипіння та відразу додають 5-6 крапель арабінози. Через декілька хвилин з'являється зелене зафарбування.

6. Дисахаради та полісахариди. Більшість дисахаридів (лактоза, мальтоза та ін.) володіють відновлюючими властивостями. На відміну від них сахароза, яка не містить вільного напівацетального гідроксилу, не дає реакції Троммера. Крохмаль також не володіє редуруючими властивостями, внаслідок незначних кількостей вільних напівацетальних гідроксилів (кінцевих).

### *Порядок виконання*

До першої пробірки наливають 20 крапель 1% розчину мальтози, до другої – сахарози, до третьої – крохмалю. Потім до кожної додають по 20 крапель 10% розчину NaOH і 2-3 краплі 2% розчину  $\text{CuSO}_4$  та нагрівають до кипіння. По кожному з проведених експериментів дають пояснення результатів, пишуть рівняння реакцій та роблять відповідні висновки.

### *Реактиви та обладнання:*

1. Глюкоза, 1% розчин.
2. NaOH, 10% розчин.
3.  $\text{CuSO}_4$ , 2% розчин.
4. Фелінгова рідина.  
Готують два розчини: А – 20,0 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  у 500 мл води; В – 100 г сегнетової солі і 75 гідроксиду натрію в 500 мл води. Розчини зберігають окремо. Перед використанням змішують рівні об'єми першого та другого розчинів.
5. Сірчана кислота, концентрована.
6. Фруктоза, 1% розчин.
7. Реактив Селіванова: 0,05 г резорцину розчиняють у 100 мл розчину соляної кислоти (1:1).
8. Арабіноза, 1% розчин.
9. Орциновий реактив: 0,2 г орцину розчиняють у 100 мл 30% розчину соляної кислоти та додають хлорид заліза (0,1 г). Розчин зберігають у темній склянці.
10. Сахароза, 1% розчин.
11.  $\alpha$ -нафтол, 1% розчин у 70% розчині етилового спирту.
12. Крохмаль, 1% розчин.



13. Мальтоза, 1% розчин.
14. Спиртівки.
15. Тримачі для пробірок.

### ***Контрольні запитання:***

1. Чим обумовлені відновлюючі властивості моно- та дисахаридів?
2. За допомогою яких реакцій виявляються моносахариди?
3. Чим обумовлена поява фіолетового забарвлення при реакції вуглеводів з  $\alpha$ -нафтолом?
4. Як реагує гідроксид міді  $\text{Cu}^{2+}$  на присутність цукрів?
5. За якою реакцією виявлення присутності вуглеводів спостерігається зелене забарвлення? Чим воно обумовлене?

### ***Лабораторна робота №8***

***Тема роботи:*** Хімічні властивості та обмін ліпідів.

***Мета роботи:*** провести експериментальні визначення фосфоліпідів та стероїдів.

### ***Структура роботи***

Найбільш біологічно важливими групами ліпідів є фосфоліпіди та стероїди. Фосфоліпіди являють собою складні ефіри, до складу яких найчастіше входять гліцерин, дві жирні кислоти, фосфорна кислота та азотисті з'єднання. Вказані речовини утворюються при гідролізі фосфоліпідів під дією ліпаз.

#### **1. Визначення фосфорної кислоти в лецитині яєчного жовтку.**

#### ***Порядок виконання***

У дві пробірки наливають по 10 крапель 1% суспензії сухого яєчного жовтку. До першої пробірки наливають 3 краплі 5% розчину панкреатину, що містить ліпазу, до другої – 3 краплі води (контроль). Пробірки розміщують у термостат за температури  $37^{\circ}\text{C}$  на 30 хвилин. Після інкубації до двох пробірок наливають по 10 крапель молібденового реактиву, нагрівають до кипіння і після охолодження спостерігають жовте зафарбовування. Пояснюють отримані результати.

## 2. Виділення холестерину з мозку.

### *Порядок виконання*

0,5 г мозку розтирають у ступці з 2-3 частинами гіпсу до гомогенної маси. Отриману масу розподіляють тонким шаром на предметному склі шпателем та висушують над полум'ям горілки на відстані 20 см.

Висушений з гіпсом мозок зіскоблюють скальпелем до сухої пробірки, заливають 2 мл хлороформу та закривають корком. Екстрагують 5 хв при кімнатній температурі шляхом постійного інтенсивного струшування. Потім екстракт фільтрують крізь сухий фільтр до сухої пробірки та здійснюють якісні реакції на холестерин.

## 3. Якісні реакції на холестерин.

### *Порядок виконання*

*Реакція Сальковського:* до 10 крапель фільтрату додають 10 крапель концентрованої сірчаної кислоти та обережно перемішують. Після відшарування рідини верхній хлороформний шар зафарбовується в червоний колір.

4. Гідроліз жирів молока ліпазою. Під дією ліпази нейтральні жири розщеплюються, реакція середовища зміщується в кислий бік за рахунок утворення жирних кислот та рожеве забарвлення фенолфталеїну зникає.

### *Порядок виконання*

У дві пробірки наливають по 10 крапель молока. У першу пробірку додають 5 крапель панкреатину, який містить ліпазу, в другу – 5 крапель води. В обидві пробірки приливають по 1 краплі 1% розчину фенолфталеїну і по краплям 1% розчину карбонату натрію до появи рожевого забарвлення, однакового в обидвох пробірках (не можна приливати надлишок розчину карбонату натрію).

Пробірки розміщують у термостат за температури 37° С на 30 хвилин. Описують та пояснюють отриманий результат. Записують рівняння реакції.

### ***Реактиви та обладнання:***

1. Сухий яєчний жовток, 1% суспензія: жовтки курячих яєць розмазують по склу та висушують на повітрі при кімнатній

температурі. Сухий жовток зіскоблюють скальпелем та розтирають у ступці до порошку.

2. Молібденовий реактив: 7,5 г молібдату амонію розчиняють у 50 мл води і додають 50 мл концентрованої азотної кислоти. Повне розчинення настає після додавання  $\text{HNO}_3$ .
3. Оцтовий ангідрид.
4. Молоко.
5. Панкреатин, 5% розчин.
6. Мозок тварин.
7. Гіпс.
8. Хлороформ.
9. Сірчана кислота, концентрована.
10. Фенолфталеїн, 1% спиртовий розчин.
11. Карбонат натрію, 1% розчин.
12. Штативи з сухими пробірками.
13. Ступка з пестиками.
14. Шпателі.
15. Корки для пробірок.
16. Термостат.
17. Предметні скельця.
18. Скальпелі.
19. Фільтри паперові.
20. Воронки діаметром 3-5 см.

### ***Контрольні запитання:***

1. Які групи ліпідів являються найбільш біологічно важливими? Чому?
2. Яка хімічна структура характерна для фосфоліпідів?
3. Яка послідовність визначення фосфорної кислоти в лецитині яєчного жовтку?
4. Яка хімічна структура характерна для холестерину?
5. Яка послідовність проведення якісних реакцій на холестерин?
6. У чому полягає механізм дії ліпаз на нейтральні жири?
7. Написати рівняння реакції гідролізу жирів ліпазою.

## Лабораторна робота №9

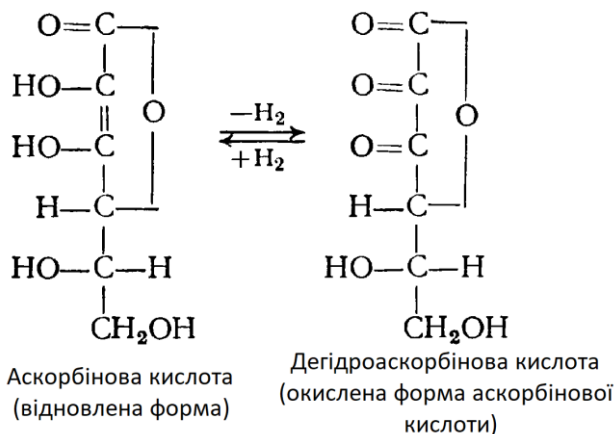
**Тема роботи:** Якісні реакції на вітамін С.

**Мета роботи:** провести лабораторні експерименти виявлення вітаміну С (аскорбінова кислота).

### Структура роботи

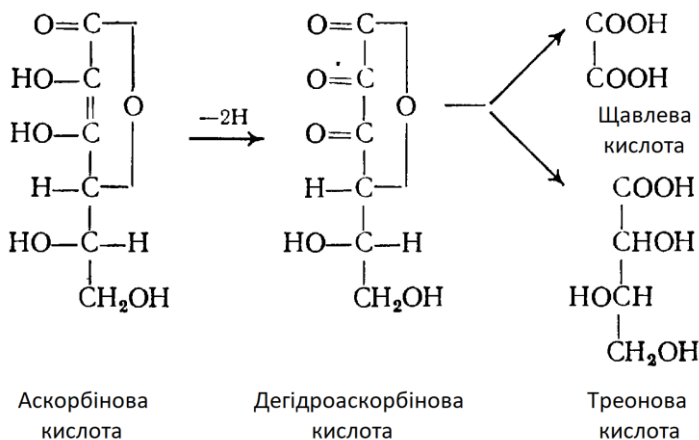
Аскорбінова кислота є лактоном ненасиченої гексонової кислоти. Наявність в її молекулі подвійного C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> зв'язку робить рухомими протони гідроксильних груп у тих же атомів, що обумовлює кислий характер з'єднання з різко вираженою редуруючою здатністю.

При окисленні аскорбінова кислота переходить у дегідроаскорбінову кислоту:



У чистому вигляді аскорбінова кислота являє собою безколірні кристали без запаху, кислі на смак, добре розчинні у воді та спирті та нерозчинні в більшості органічних розчинників.

У кристалічному вигляді аскорбінова кислота стійка, але в присутності окиснювачів легко руйнується в водних і особливо лужних розчинах, утворюючи щавлеву та треонову кислоти.



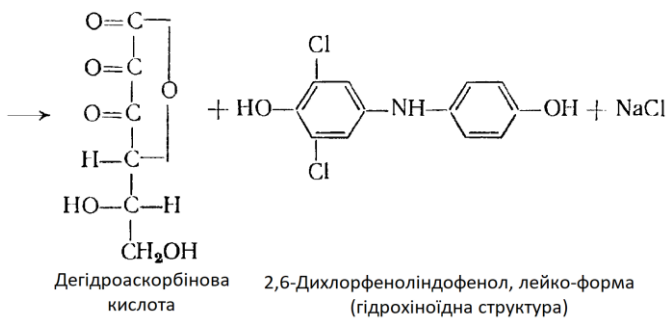
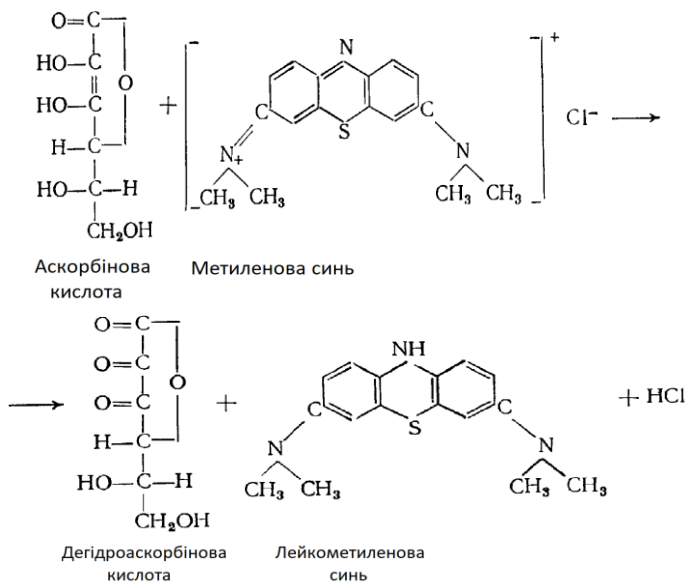
1. Відновлення ферицианіду калію вітаміном С. Аскорбінова кислота, яка міститься у витяжці з шипшини, відновлює заліzosинеродний калій  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  до залізо-синеродного калію  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , який утворює з хлорним залізом погано розчинну в воді сіль трьох валентного заліза – берлінську лазур, що випадає у вигляді темно-синього осаду.

#### *Порядок виконання*

До двох пробірок вносять по 2-3 краплі 5% розчину заліzosинеродного калію та 1% розчину хлорного заліза, рідина набуває бурого кольору.

Після додавання в одну з пробірок 5-10 крапель 1% витяжки з шипшини, а до іншої такої ж кількості дистильованої води, - у першій пробірці рідина зафарбовується в зеленувато-синій колір і згодом випадає темно-синій осад берлінської лазури  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ , котрий при обережному нашаровуванні дистильованої води стає більш вираженим. У другій пробірці рідина не змінює колір.

2. Відновлення метиленової сині та 2,6-дихлорфеноліндофенола вітаміном С. Витяжка шипшини, що містить вітамін С, знебарвлює розчини метиленової сині та 2,6-дихлорфеноліндофенолу, відновлюючи обидві фарби в лейкоз'єднання:



### Порядок виконання

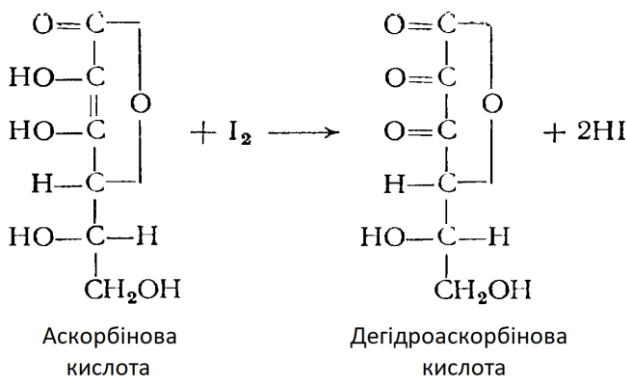
У двох пробірках змішують по 1 краплині 0,01% розчину метиленової сині і 10% розчину бікарбонату натрію, додаючи потім до однієї з них 5 крапель 1% витяжки з шипшини, а до іншої - стільки ж дистильованої води.

Нагрівання пробірок над полум'ям горілки призводить до знебарвлення рідини в пробірці з витяжкою з шипшини.

До інших двох пробірок наливають по 10 крапель 0,01% розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, додаючи в одну з пробірок 1 краплю 2% розчину соляної кислоти.

У цій пробірці розчин зафарбовується в червоний колір. При додаванні в обидві пробірки 5-10 крапель витяжки з шипшини розчини знебарвлюються за рахунок відновлення аскорбінової кислоти 2,6-дихлорфеноліндофенолом у лейкоз'єднання.

3. Йодна проба на вітамін С. Розчин йоду в йодиді калію при додаванні до нього витяжки з шипшини знебарвлюється за рахунок відновлення аскорбіновою кислотою молекулярного йоду та утворення йодистоводневої кислоти:



### Порядок виконання

До двох пробірок наливають по 10 крапель дистильованої води і по 1-2 краплі розчину йоду в розчині йодиду калію. До однієї пробірки додають 10 крапель витяжки шипшини, до іншої – стільки ж дистильованої води. У пробірці витяжки з шипшини розчин йоду знебарвлюється.

Отримані результати та висновки зводять у таблицю:

### *Якісне визначення вітаміну С*

Досліджуваний матеріал	Хімічна структура вітаміну	Використані реактиви	Отримане зафарбування	Чим обумовлена реакція

#### ***Реактиви та обладнання:***

1. Шипшина, екстракт.
2. Калій залізосинеродний, 5% розчин.
3. Залізо хлорне, 1% розчин.
4. Метиленова синь, 0,01% розчин.
5. Натрій кислий вуглекислий, 10% розчин.
6. Пробірки.
7. Піпетки очні.

#### ***Контрольні запитання:***

1. У чому полягає біологічне значення вітаміну С?
2. В яку форму переходить аскорбінова кислота в процесі окислення?
3. Які речовини здатний відновлювати вітамін С?

### ***Лабораторна робота №10***

***Тема роботи:*** Якісні реакції на вітаміни групи В.

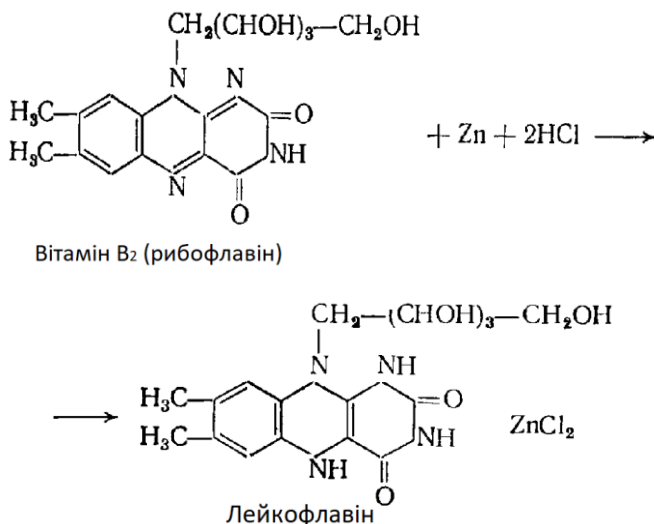
***Мета роботи:*** провести лабораторні експерименти виявлення вітамінів групи В.

#### ***Структура роботи***

Вітаміни групи В відносяться до ряду водорозчинних вітамінів і відіграють ключову роль у забезпеченні нормального функціонування мозку і нервової системи, а також формування крові в організмі людини. Вітамін В, як правило, бере участь у метаболізмі кожної клітини людського організму, особливо це стосується синтезу та регулювання ДНК, а також синтезу жирних кислот і виробництва енергії.



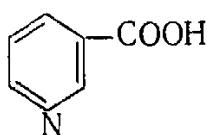
1. Реакція відновлення вітаміну В<sub>2</sub>. Водень, що утворюється при додаванні металевого цинку з концентрованою соляною кислотою, відновлює рибофлавін через проміжне з'єднання червоного кольору (родофлавін) у безколірний лейкофлавін. При цьому жовте зафарбування розчину переходить у рожеве, потім розчин знебарвлюється. Основний механізм реакції може бути представлений наступним рівнянням:



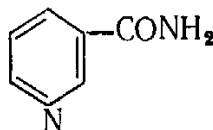
#### *Порядок виконання*

10 крапель зависі рибофлавіну в воді (0,025%) наливають у пробірку, додаючи туди ж 5 крапель концентрованої соляної кислоти та невелику часточку металевого цинку. Водень, що виділяється реагує з рибофлавіном та розчин змінює зафарбування з жовтого на червоне та рожеве, а потім знебарвлюється.

2. Проба з міддю на нікотинову кислоту. Нікотинова кислота при нагріванні з розчином оцтовокислої міді утворює синій осад погано розчинної мідної солі.



Никотинова кислота

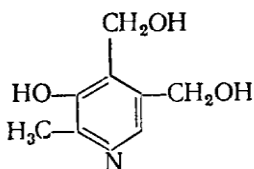


Никотиномід

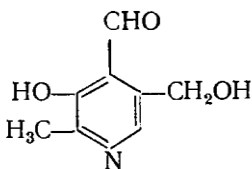
### Порядок виконання

Розчиняють 10 мл нікотинової кислоти при нагріванні в 20 краплях 10% розчину оцтової кислоти. До нагрітого до кипіння розчину додають рівний об'єм 5% розчину оцтовокислої міді. При поступовому охолодженні розчину випадає синій осад мідної солі нікотинової кислоти.

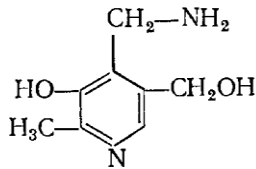
3. Ферихлоридна проба на вітамін В<sub>6</sub>. Активністю вітаміну В<sub>6</sub> володіє група речовин, похідних піридину, які мають спільну назву піридоксин. Ці речовини відрізняються лише характером замінного радикалу в 4-му положенні – піридоксол, піридоксаль, піридоксамін.



Піридоксол



Піридоксаль



Піридоксамін

Вільні основи цих з'єднань та їх солянокислі солі являють собою кристалічні порошки гіркуватого присмаку, добре розчинні в воді, гірше в спирті та нерозчинні в ефірі та хлороформі.

Форма вітаміну В<sub>6</sub> монохлоргідрат піридоксолу (лікарська форма) розчинна у воді та спирті, витримує нагрівання в розчинах мінеральних кислот та лугів, у нейтральному та лужному середовищі легко розкладається на світлі. Сильні окиснювачі розкладають її.

Безколірний розчин вітаміну В<sub>6</sub> набуває червоного забарвлення в присутності хлорного заліза, що обумовлено утворенням комплексної солі типу фенолята заліза червоного кольору.

### Порядок виконання

У пробірці змішують 5 крапель 5% водного розчину вітаміну В<sub>6</sub> і 1 краплю 5% розчину хлорного заліза та струшують її. Суміш зафарбовується в червоний колір. Отримані результати та висновки зводять у таблицю:

*Якісне визначення вітамінів групи В*

Досліджу- ваний матеріал	Наймену- вання вітаміну	Хімічна структура вітаміну	Використані реактиви	Отримане зафарбування	Чим обумовлена реакція
	В <sub>2</sub>				
	...				

***Реактиви та обладнання:***

1. Рибофлавін, 0,025% завислий у воді.
2. Соляна кислота, концентрована.
3. Цинк металевий.
4. Нікотинова кислота в порошку.
5. Оцтова кислота, 10% розчин.
6. Мідь оцтовокисла, 5% розчин.
7. Піридоксин, 5% розчин.
8. Залізо хлорне, 5% розчин.
9. Пробірки.
10. Піпетки очні.

***Контрольні запитання:***

1. Яке біологічне значення мають вітаміни групи В?
2. Надати загальну хімічну характеристику вітамінів групи В.
3. Опишіть механізм відновлення вітаміну В<sub>2</sub>.
4. У чому полягає суть методу якісного визначення нікотинової кислоти?
5. Які речовини представляють вітамін В<sub>6</sub>?
6. Пояснити особливості та властивості форми вітаміну групи В - монохлоргідрат піридоксол.
7. Що обумовлює появу червоного забарвлення вітаміну В<sub>6</sub> в присутності хлорного заліза?

## Рекомендована література

1. Білецька Л. П., Гринчишин Н. М., Кобилінська Л. І., Лозинська І. І., Мазур О. Є., Склярів О. Я., Федевич Ю. М., Фоменко І. С., Хаврона О. П. Біологічна хімія : навчально-методичний посібник для студентів фармацевтичного факультету (другий магістерський рівень). Львів : ЛНМУ імені Данила Галицького, 2019. 126 с.
2. Вороніна Л. М., Десенко В. Ф., Мадієвська Н. М., Кравченко В. М., Сахарова Т. С., Савченко Л. Г., Шоно Н. А. Біологічна хімія : підручник. Х. : Основа; Видавництво НФАУ, 2000. 608 с.
3. Губський Ю. І. Біологічна хімія : підручник. Київ-Тернопіль : Укрмедкнига, 2000. 508 с.
4. Коннова С. А., Галицкая А. А., Плешакова Е. В., Каневский М. В., Федоненко Ю. П. Методическое пособие к малому практикуму по биохимии. Саратов : 2017. 75 с.
5. Лисиця А. В. Біохімія. Практикум. Київ : Університетська книга, 2019. 240 с.
6. Остапченко Л. І., Компанець І. В., Скопенко О. В., Синельник Т. Б., Кравченко О. О., Береговий С. М. Біохімія : практикум. Київ : Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2018. 296 с.
7. Сенчук В. В., Мохарева С. И., Орел Н. М., Зырянова Т. Н., Кукулянская Т. А., Семак И. В. Биохимия. Лабораторный практикум : учеб. пособие. Минск : БГУ, 2004. 77 с.
8. Столяр О. Б. Біологічна хімія. Київ : КНТ, 2020. 368 с.
9. Сухаренко О. В., Недзвецький В. С. Біохімія. Лабораторний практикум і завдання модульного контролю. Київ : Ліра-К, 2014. 196 с.
10. Трач В. М., Сибіль М. Г., Гложик І. З., Башкін І. М. Практикум з біохімії : навч. посіб. Львів : ЛДУФК, 2014. 238 с.